

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00378

膜联蛋白 A7 与 IGFBP2 结合抑制肝癌细胞增殖

王玉招, 刘 音, 郭瀛军, 孙树汉*

第二军医大学基础部医学遗传学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 分析膜联蛋白 A7(ANXA7)与肝癌发生的相关性及筛选、鉴定 ANXA7 的相互作用分子,探讨 ANXA7 在肝癌发生中的机制。**方法** 通过实时定量 PCR 法检测 48 对肝癌与癌旁组织以及多种肝和肝癌细胞株中 ANXA7 表达量的差异,并通过肝癌细胞 ANXA7 过表达及特异性干扰抑制分析其对肝癌细胞增殖的影响。采用免疫共沉淀法筛选与 ANXA7 发生结合的蛋白,并以点突变法分析蛋白质相互作用的关键位点;用蛋白免疫印迹法分析了 ANXA7 对肝癌相关的重要信号通路中 ERK1/2 磷酸化水平的影响。**结果** ANXA7 在肝癌组织与肝癌细胞中均呈下调表达。胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (insulin-like growth factor binding protein 2,IGFBP2)能与 ANXA7 蛋白发生特异性结合,且 IGFBP2 上的 RGD 序列是两者结合的关键位点。肝癌细胞中 ANXA7 表达上调能抑制肿瘤细胞增殖($P<0.05$),并能使 IGFBP2 介导的 ERK1/2 的磷酸化水平降低。下调 ANXA7 的表达可促进肝癌细胞增殖($P<0.01$),磷酸化 ERK1/2 的水平升高。**结论** ANXA7 可能作为一种抑癌基因,通过介导 IGFBP2 对 ERK1/2 磷酸化水平的影响参与对肝癌增殖的调控。

[关键词] 膜联蛋白 A7;肝细胞癌;胰岛素样生长因子结合蛋白 2;细胞增殖

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)04-0378-05

Annexin A7 inhibits proliferation of hepatoma cells via binding with IGFBP2

WANG Yu-zhao, LIU Yin, GUO Ying-jun, SUN Shu-han*

Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the role of Annexin A7(ANXA7) in the development of HCC by analyzing ANXA7 expression in hepatocarcinogenesis and identifying its potential interaction molecule. **Methods** ANXA7 mRNA expression was analyzed by real-time PCR in 48 HCC tissues and tumor adjacent tissues, and different hepatic cancer tissues and cell lines. To analyze the effect of ANXA7 on hepatoma proliferation, ANXA7 was overexpressed or inhibited by specific siRNA in hepatic cancer cells. Co-immunoprecipitation (co-IP) method was used to detect the specific binding protein of ANXA7 in HCC cells. The key sites of protein interaction were analyzed by point mutation. Western blotting analysis was used to study the effect of ANXA7 on IGFBP2 activated ERK1/2 phosphorylation. **Results** The expression of ANXA7 was down-regulated in both hepatoma tissue samples and hepatoma cell lines. Insulin-like growth factors binding protein 2 (IGFBP2) could specifically bind with ANXA7 through the key RGD site. Up-regulated expression of ANXA7 could inhibit the proliferation of tumor cells ($P<0.05$) and decrease the phosphorylation of ERK1/2. Accordingly, down-regulated expression of ANXA7 could enhance the proliferation of tumor cells ($P<0.01$) and increase phosphorylation of ERK1/2 in HCC cells. **Conclusion** ANXA7 may serve as a potential tumor suppressive molecule, participating in the regulation of IGFBP2-activated ERK1/2 phosphorylation and affecting the proliferation of hepatoma cells.

[Key words] annexin A7; hepatocellular carcinoma; insulin-like growth factor binding protein 2; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(4): 378-382]

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种受多因素影响、多基因调控的复杂疾病,病死率居恶性肿瘤第二位^[1-2]。探讨 HCC 发生发展相关的因素及分子机制,有助于寻找肝癌早期诊断、转移和复发预测的生物学标记和治疗靶标,对

于疾病的诊疗及预测预后具有重要的临床意义。

膜联蛋白(Annexins, ANX)是一类 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白,研究发现该基因家族中多个分子与包括肝癌在内的多种肿瘤的发生、发展密切相关^[3]。其中膜联蛋白 A7(ANXA7)在一些组织中表现出肿

[收稿日期] 2014-11-03 **[接受日期]** 2015-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金(81071700,31171251)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81071700,31171251)。

[作者简介] 王玉招,实验师。E-mail: wangyuzhao12@smmail.cn

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81871053, E-mail: shsun@vip.sina.com

瘤抑制基因的活性^[4-7],但是其是否与肝癌的发生存在潜在的关联尚不清楚。本研究分析了 ANXA7 表达与肿瘤的相关性。通过筛选与 ANXA7 抗肿瘤相关的信号分子,进一步探讨了其调节机制,为进一步阐述 HCC 发生、发展机制及寻求 HCC 防治新方法提供新线索。

1 材料和方法

1.1 组织与细胞 收集 48 对肝癌组织及其癌旁组织,新鲜冰冻,存放于液氮中。组织标本均来自第二军医大学东方肝胆外科医院,并获得患者的知情同意;人正常肝细胞 L02 与人肝癌细胞 LM3、SMMC7721、Huh7、HepG2、MHCC97H 均购自中国科学院细胞库。以上细胞用 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清,Gibco 公司),培养条件为 5% CO₂、37℃,细胞培养至对数生长期备用。

1.2 荧光实时定量 PCR 检测 ANXA7 mRNA 的表达 应用 Qiagen 公司的 RNeasy Mini kit 提取组织或细胞总 RNA;以 Invitrogen 公司的 M-MLV 反转录酶进行 RT-PCR 获得 cDNA,按试剂盒说明进行操作。采用 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪进行定量 PCR 分析, β -actin 为内参,每个样本重复 3 次。采用相对定量的方法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)检测目的基因 mRNA 水平。所有实验都完全独立的重复 3 次,取平均值作为最后数据。

1.3 表达载体的构建 以人正常肝细胞 L02 的 cDNA 为模板,经 PCR 法扩增获得胰岛素样生长因子结合蛋白 2(IGFBP2)和含融合蛋白 HA 标签的人 ANXA7 的 DNA 片段,分别插入真核表达载体 pcDNA3.0 的多克隆位点 *Bam*H I 和 *Xba* I,构建重组载体 pcDNA3-HA-ANXA7 和 pcDNA3-IGFBP2。测序法筛选鉴定阳性克隆。

1.4 siANXA7 重组体的构建 ANXA7 特异性小干扰 RNA,即 siANXA7,由上海吉玛制药技术有限公司设计合成。阳性对照采用已经确认有效的靶向管家基因之一 GAPDH 的 siRNA;阴性对照是选择与目的基因的序列和哺乳动物基因无同源性的 siRNA。

1.5 细胞转染 采用 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2 000 试剂进行细胞瞬时转染,按试剂盒标准流程操作。脂质体-核酸复合物加入培养细胞 5 h 后更换含血清培养基,在 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养。

1.6 细胞增殖活性检测 将 pcDNA3-HA-ANXA7 过表达质粒以及对照质粒 pcDNA3.0 分别瞬时转染人肝癌细胞系 SMMC7721,分析 ANXA7

过表达对细胞增殖的影响。此外,也以 siANXA7 以及各自的阴性对照转染 SMMC7721,分析 ANXA7 表达抑制对细胞增殖的影响。细胞铺于 96 孔板,分别在转染后 0、12、24、36 和 48 h,按每孔 10 μ L 加入 CCK-8 试剂,继续培养 2 h 后,使用酶标仪测定 450 nm 光密度 D_{450} ,来分析细胞的增殖。

1.7 免疫共沉淀 采用 Thermo Scientific 公司的 ProFound™ HA Tag IP/Co-IP Kit。将 SMMC7721 细胞铺于 6 孔板中,24 h 后待细胞融合度达到 90% 左右时将质粒(pcDNA3-HA-ANXA7 和 pcDNA3-HA)按 4 μ g/孔的量转染细胞。转染后 48 h 加入细胞裂解液裂解细胞。细胞裂解采用温和的裂解条件,不能破坏细胞内存在的所有蛋白质-蛋白质相互作用,采用非离子变性剂 Triton X-100,细胞裂解液中加入酶抑制剂混合物。将离心柱装入离心管中,并在离心柱中加入适量的细胞裂解液。反复颠倒使含有抗 HA 标签的琼脂糖匀浆充分混匀。按照每离心管 10 μ L 的量(含有 5 μ g anti-HA 抗体)将琼脂糖匀浆加入离心管中,盖紧离心管盖,4℃孵育过夜。将收集管接于离心柱之下,短暂离心,弃滤液。按照每管 0.5 mL 的量将 Tris 生理盐水-吐温缓冲液(TBST, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20)溶液加入离心柱中。盖上盖子,轻柔颠倒混匀 2~3 次,短暂离心,弃去滤液。重复步骤两次。将离心柱装入一新的收集管中。加入 25 μ L 2×非还原样品缓冲液,轻柔混匀。将离心柱置于 95×100℃热激 5 min,13 500×g 离心 1 min。在收集的样品中加入 2~3 μ L 1 mol/L 的二硫苏糖醇(dithiothreitol,DTT),样品立即进行 SDS-PAGE。考马斯亮蓝染色、观察、切胶、质谱分析。

1.8 蛋白免疫印迹(Western blotting)检测目的蛋白表达水平 SDS-PAGE 进行后凝胶用电泳法转至 PVDF 膜,室温下使用封闭液封闭 2 h, TBST 缓冲液洗涤 10 min×3 次,根据说明书所示的稀释比,使用抗体稀释液稀释一抗,一抗工作液在 4℃条件下孵育过夜。免疫共沉淀结合蛋白免疫印迹的检测中,采用一抗为兔抗-IGFBP2 抗体(Santa Cruz 公司)。在 ERK1/2 磷酸化水平的蛋白免疫印迹检测中,采用一抗为小鼠抗- β -actin 单抗,小鼠抗 p-ERK1/2 单抗和小鼠抗 ERK1/2 单抗(均购自 Cell Signaling)。TBST 洗涤 10 min×3 次,室温下使用封闭液进行二次封闭 2 h, TBST 洗涤 10 min×1 次,使用抗体稀释液稀释标记二抗,二抗工作液在 37℃条件下孵育 2 h, TBST 洗 10 min×3 次。加入

显色底物 DAB 暗处作用 1 min, 双蒸水终止显色。其中, β -actin 作为蛋白定量的内参照。

1.9 定点突变 采用 QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 试剂盒, 对已构建的包含人 IGFBP2 序列的 pcDNA3-IGFBP2 质粒中的 RGD 序列进行点突变。以 pcDNA3-IGFBP2 质粒为模板, 进行突变链合成反应, 反应体系如下: $10\times$ 反应缓冲液 $5\ \mu\text{L}$, dNTP mix ($2.5\ \text{mmol/L}$ each dNTP) $5\ \mu\text{L}$, 质粒模板 (总量约 $5\sim 50\ \text{ng}$) $0.5\ \mu\text{L}$, 上下游引物各 $1.25\ \mu\text{L}$ ($10\ \mu\text{mol/L}$), PfuTurbo DNA 聚合酶 $1\ \mu\text{L}$, 双蒸水 (ddH₂O) 补齐 $50\ \mu\text{L}$, 混合物加入平头薄壁 PCR 管中, 充分振荡混匀后, 稍离心, 然后按下列条件进行反应: 95°C 预变性 $30\ \text{s}$; 循环条件为 95°C 变性 $30\ \text{s}$, 55°C 退火 $1\ \text{min}$, 68°C 延伸 $6\ \text{min}$, 共 18 个循环。所得 PCR 产物取 $5\ \mu\text{L}$ 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察产物条带。剩余反应产物进行 Dpn I 限制性酶切消化。感受态细胞转化、挑克隆、测序鉴定阳性突变质粒及突变位点。

1.10 统计学处理 所有数据均使用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示。数据采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计分析, 组间比较采用方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 ANXA7 在肝癌组织及多种肝癌细胞系中表达 通过荧光实时定量 PCR 检测 48 例肝癌患者的

癌与癌旁组织中 ANXA7 mRNA 的变化, 结果显示相较癌旁组织, ANXA7 在癌组织中表达下调 (0.87 ± 0.56 vs 4.26 ± 2.14 , $P<0.01$); ANXA7 在 5 种肝癌细胞系 LM3、SMMC7721、Huh7、HepG2、MHCC97H 中 mRNA 水平均低于正常肝细胞 L02 ($P<0.01$, 图 1)。

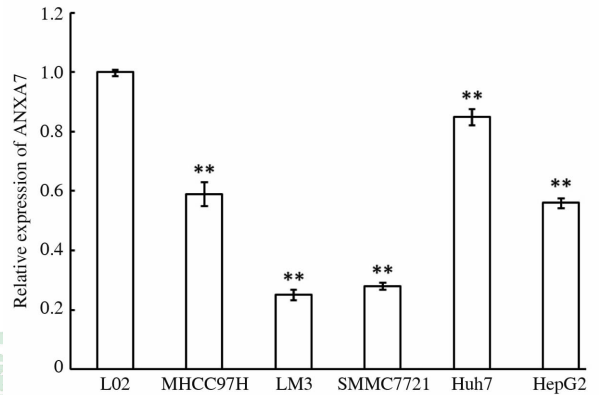


图 1 ANXA7 mRNA 在不同肝细胞系中表达分析
Fig 1 ANXA7 mRNA expression analysis in different hepatoma cell lines

** $P<0.01$ vs L02 liver cell line. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

2.2 ANXA7 抑制肝癌细胞 SMMC7721 的增殖 结果显示, 转染 36 h 和 48 h 时 pcDNA3-HA-ANXA7 转染组较 pcDNA3.0 空载体转染组的 CCK8 检测值降低 ($P<0.05$, 图 2), 提示上调 ANXA7 表达能够抑制肿瘤生长, 而下调 ANXA7 的表达促进肿瘤细胞增殖 ($P<0.01$, 图 2)。

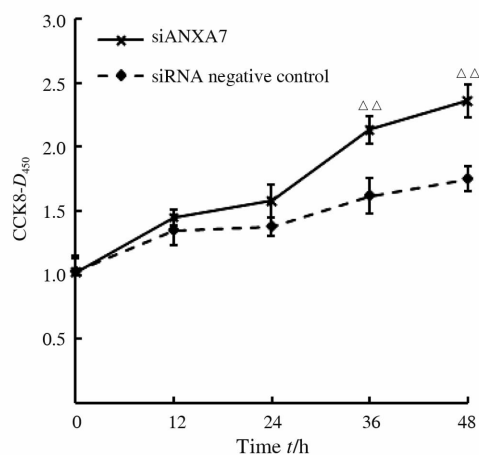
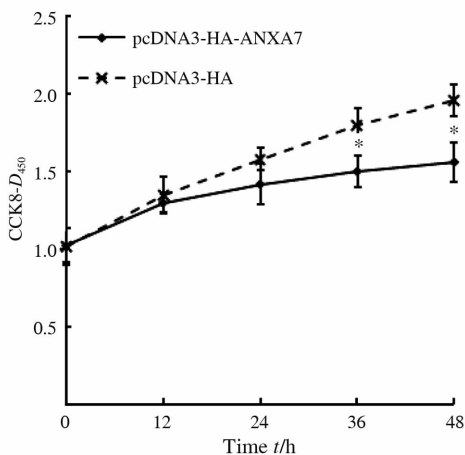


图 2 ANXA7 表达对人肝癌细胞 SMMC7721 增殖的影响

Fig 2 ANXA7 increased proliferative activity of hepatic cancer SMMC7721 cells

* $P<0.05$ vs pcDNA3-HA; $\triangle\triangle P<0.01$ vs siRNA negative control. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

2.3 肝癌细胞中 IGFBP2 特异结合 ANXA7 差异电泳条带分离后的结果显示, ANXA7 能与 IGFBP2

结合。经重复实验, 该蛋白特异性存在免疫共沉淀的结合蛋白组分中。通过蛋白免疫印迹法反向验

证, 结果进一步提示两者在肝癌细胞系 SMMC7721 中存在结合作用(图 3)。

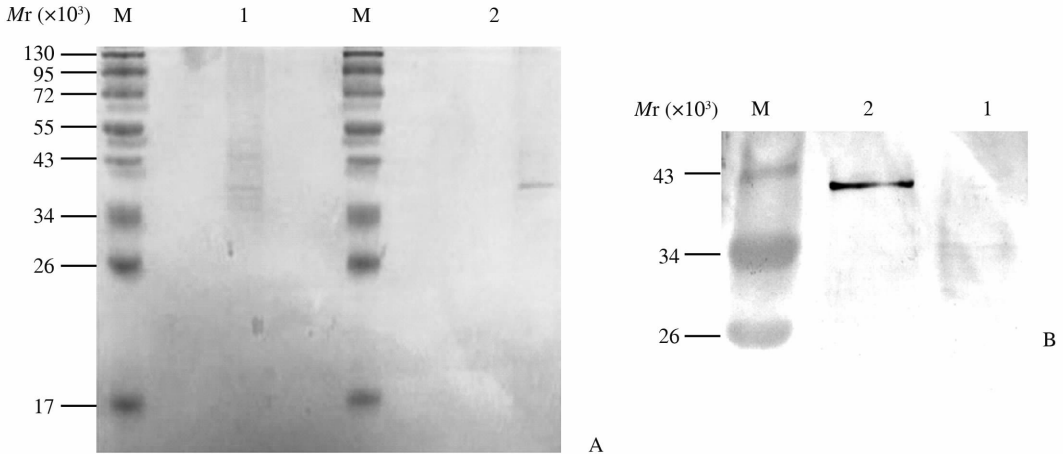


图 3 免疫共沉淀法筛选及验证 ANXA7 相互作用蛋白

Fig 3 Identification and validation of binding protein with ANXA7 by co-immunoprecipitation

A: SDS-PAGE analysis of the ANXA7 binding protein with ANXA7 after co-immunoprecipitation; B: Western blotting analysis of insulin-like growth factors binding protein 2 in co-immunoprecipitation samples with ANXA7. Protein marker: Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas). M:Marker; 1: pcDNA3-HA; 2:pcDNA3-HA-ANXA7

2.4 IGFBP2 的 RGD 序列是与 ANXA7 结合的关键位点。结果突变组未能检测到 IGFBP2 的存在。结果提示, ANXA7 可通过 IGFBP2 上 RGD 序列介导与 IGFBP2 结合(图 4)。

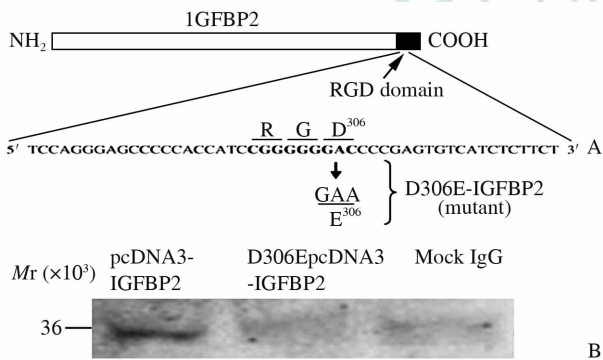


图 4 IGFBP2 的 RGD 序列突变分析

Fig 4 Mutation analysis of RGD sequence in IGFBP2

IGFBP2; Insulin-like growth factors binding protein 2. A: Schematic diagram of mutation site in IGFBP2; B: Western blotting analysis of IGFBP2

2.5 ANXA7 经 IGFBP2 参与对 ERK1/2 磷酸化水平的调节。结果显示, 肝癌细胞中 ANXA7 与 IGFBP2 共表达的细胞比仅表达 ANXA7 细胞的磷酸化 ERK1/2 蛋白水平低, 提示过表达 ANXA7 能抑制 IGFBP2 激活的 ERK1/2 的磷酸化水平; 反之, ANXA7 的特异性干扰则使 IGFBP2 活化 ERK1/2

的作用进一步增强(图 5)。

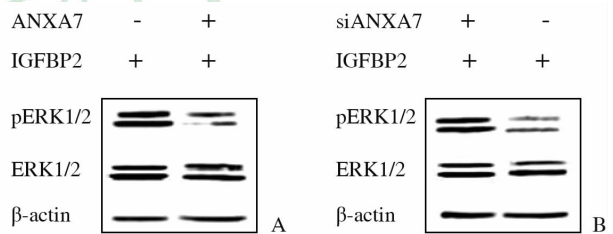


图 5 ANXA7 影响 IGFBP2 激活的 ERK1/2 磷酸化的蛋白免疫印迹分析

Fig 5 Effect of ANXA7 on IGFBP2 activated ERK1/2 phosphorylation as shown by Western blotting analysis

IGFBP2; Insulin-like growth factors binding protein 2. A: SMMC7721 cells were co-transfected with IGFBP2 and ANXA7 expressing plasmids. B: SMMC7721 cells were co-transfected with IGFBP2 expressing plasmid and siANXA7. Non-specific siRNA was used as control

3 讨论

ANX 是一类钙依赖的磷脂结合蛋白。其中某些成员的功能异常可引起肿瘤细胞增殖调控异常, 结构缺失或改变影响肿瘤转移潜能; 部分膜联蛋白还具有影响肿瘤凋亡和分化的功能^[10-13]。ANXA7 是最早被分离纯化出来的膜联蛋白, 以往的研究发现 ANXA7 在一些组织中表现出抑制基因活性, 其表达失调与肿瘤进展和预后密切相关^[14]。据报道,

在 4 061 例包含多种肿瘤的组织芯片结果中发现 ANXA7 表达下调^[6],这与本研究中病例样本和肝癌细胞中的结果一致。

本研究进一步通过免疫共沉淀实验发现 ANXA7 与 IGFBP2 能发生特异性结合,鉴于 IGFBP2 的 RGD 序列是与多种蛋白结合的关键位点,推测其与 ANXA7 结合也极有可能通过该位点介导。因此通过定点突变法得到 IGFBP2 的 RGD 位点突变质粒,采用免疫共沉淀结合蛋白免疫印迹的方法确定了 ANXA7 与 IGFBP2 的结合是通过 IGFBP2 中 RGD 序列介导的。

IGFBP2 是一种在人的多种体液和组织中均有表达的分泌蛋白,属于 IGF 系统的组成成员,参与重要的网络调控,调节多种细胞过程^[15-16],激活 ERK1/2、SAPK/JNK 和 p38 途径^[8],并且能升高 ERK1/2、SAPK/JNK 的磷酸化水平^[9]。其中,ERK 的信号转导 (Ras-Raf-MEK-ERK) 被多种生长因子、细胞因子及促分裂剂激活,在细胞的增殖和分化调控中发挥重要作用,是多种信号的交汇点或共同通路^[17-18]。本研究发现,IGFBP2 在肝癌中能够激活 ERK1/2 的磷酸化,在此基础上进一步分析了 ANXA7 是否通过 IGFBP2 参与了对 ERK1/2 磷酸化的调节作用。结果显示在 IGFBP2 存在的情况下,下调 ANXA7 表达能使 ERK1/2 的磷酸化水平升高,很好地解释了 ANXA7 抑制肝癌细胞生长的作用。我们后续将针对 IGFBP2 进行干预,观察其被干预后对肝癌细胞增殖的影响,进一步说明 ANXA7 与 IGFBP2 在功能上的相关性。

[参考文献]

[1] Flores A, Marrero J A. Emerging trends in hepatocellular carcinoma: focus on diagnosis and therapeutics [J]. *Clin Med Insights Oncol*,2014,8:71-76.

[2] Hashimoto E, Tokushige K. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis: growing evidence of an epidemic? [J]. *Hepato Res*,2012,42:1-14.

[3] Laohavisit A, Davies J M. Annexins[J]. *New Phytol*,2011,189:40-53.

[4] Srivastava M, Bubendorf L, Srikantan V, Fossom L, Nolan L, Glasman M, et al. ANX7, a candidate tumor suppressor gene for prostate cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98:4575-4580.

[5] Taniuchi K, Yokotani K, Saibara T. BART inhibits pancreatic cancer cell invasion by PKC α inactivation through binding to ANX7 [J]. *PLoS One*,2012,7:e35674.

[6] Srivastava M, Torosyan Y, Raffeld M, Eidelman O, Pollard H B, Bubendorf L. ANXA7 expression repre-

sents hormone-relevant tumor suppression in different cancers [J]. *Int J Cancer*,2007,121:2628-2636.

- [7] Mears D, Zimlik C L, Atwater I, Rojas E, Glassman M, Leighton X, et al. The Anx7 (+/-) knockout mutation alters electrical and secretory responses to Ca²⁺-mobilizing agents in pancreatic β -cells [J]. *Cell Physiol Biochem*,2012,29:697-704.
- [8] Madoz-Gurpide J, Lopez-Serra P, Martinez-Torrecuadrada J L, Sanchez L, Lombardia L, Casal J I. Proteomics-based validation of genomic data-applications in colorectal cancer diagnosis [J]. *Mol Cell Proteom*,2006,5:1471-1483.
- [9] Wozny W, Schroer K, Schwall G P, Poznanovic S, Stegmann W, Dietz K, et al. Differential radioactive quantification of protein abundance ratios between benign and malignant prostate tissues: cancer association of annexin A3 [J]. *Proteomics*,2007,7:313-322.
- [10] Bandorowicz-Pikula J, Woś M, Pikula S. Participation of annexins in signal transduction, regulation of plasma membrane structure and membrane repair mechanisms [J]. *Postepy Biochem*,2012,58:135-148.
- [11] Gerke V, Creutz C E, Moss S E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2005,6:449-461.
- [12] Hayes M J, Longbottom R E, Evans M A, Moss S E. Annexinopathies [J]. *Subcell Biochem*,2007,45:1-28.
- [13] Rescher U, Gerke V. Annexins- unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J Cell Sci*,2004,117:2631-2639.
- [14] Uzoh C C, Holly J M, Biernacka K M, Persad R A, Bahl A, Gillatt D, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-2 promotes prostate cancer cell growth *via* IGF-dependent or -independent mechanisms and reduces the efficacy of docetaxel [J]. *Br J Cancer*,2011,104:1587-1593.
- [15] Hamidouche Z, Fromigué O, Ringe J, Häupl T, Marie P J. Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation [J]. *BMC Cell Biol*,2010,11:44.
- [16] Chesik D, De Keyser J, Wilczak N. Insulin-like growth factor binding protein-2 as a regulator of IGF actions in CNS: implications in multiple sclerosis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*,2007,18:267-278.
- [17] Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand J C, Fouret P. Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation [J]. *Am J Pathol*,2003,163:957-967.
- [18] Tsukada Y, Miyazawa K, Kitamura N. High intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *J Biol Chem*,2001,276:40968-40976.